

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI DAUN JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP
NYAMUK *Aedes aegypti* L. DAN *Culex quinquefasciatus* S.
DENGAN METODE WHOPES**

NASKAH PUBLIKASI



Oleh :

AYUN RIA CAHYANTI

NIM. I21111026

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK
2015**

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI DAUN JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP
NYAMUK *Aedes aegypti* L. DAN *Culex quinquefasciatus* S.
DENGAN METODE WHOPES**

NASKAH PUBLIKASI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi
(S. Farm) pada Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**



Oleh :

AYUN RIA CAHYANTI

NIM. 121111026

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2015

NASKAH PUBLIKASI

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI DAUN JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP NYAMUK
Aedes aegypti L. DAN *Culex quinquefasciatus* S.
DENGAN METODE WHOPES**

Oleh :
AYUN RIA CAHYANTI
NIM. I21111026

Telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura
Tanggal : 02 Oktober 2015

Disetujui

Pembimbing Utama,

Moh. Andrie, M.Sc., Apt.
NIP. 198105082008011008

Penguji Pertama,

Indri Kusharyanti, M.Sc., Apt.
NIP. 198303112006042001

Pembimbing Pendamping,

Sri Luliana, M.Farm., Apt.
NIP. 198012262008122002

Penguji Kedua,

Nera Umilia Purwanti, M.Sc., Apt.
NIP. 198102242008122003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura

dr. Arif Wicaksono, M. Biomed
NIP. 198310302008121002

Lulus Tanggal : 02 Oktober 2015
No. SK Dekan FK : 4522/UN22.9/DT/2015
Tanggal SK : 15 Oktober 2015

NASKAH PUBLIKASI

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI DAUN JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP NYAMUK
Aedes aegypti L. DAN *Culex quinquefasciatus* S.
DENGAN METODE WHOPES**

**Oleh :
AYUN RIA CAHYANTI
NIM. I21111026**

**Telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura
Tanggal : 02 Oktober 2015**

Disetujui


Pembimbing Utama,


Moh. Andrie, M.Sc., Apt.
NIP. 198105082008011008

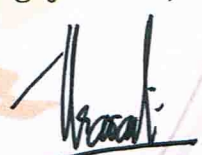
Pembimbing Pendamping,


Sri Luliana, M.Farm., Apt.
NIP. 198012262008122002

Penguji Pertama,


Indri Kusharyanti, M.Sc., Apt.
NIP. 198303112006042001

Penguji Kedua,


Nera Umilia Purwanti, M.Sc., Apt.
NIP. 198102242008122003

**Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**


dr. Arif Wicaksono, M. Biomed
NIP. 198310302008121002

**Lulus Tanggal : 02 Oktober 2015
No. SK Dekan FK : 4522/UN22.9/DT/2015
Tanggal SK : 15 Oktober 2015**

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI DAUN JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP NYAMUK
Aedes aegypti L. DAN *Culex quinquefasciatus* S.
DENGAN METODE WHOPES**

**ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM JERUK SAMBAL'S LEAVES
(*Citrus microcarpa*) AS REPELLENT AGAINST *Aedes aegypti* L.
AND *Culex quinquefasciatus* S. MOSQUITOS
USING WHOPES METHOD**

Ayun Ria Cahyanti, Moh. Andrie, Sri Luliana

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak

Abstrak : Demam berdarah dengue (DBD) dan filariasis adalah penyakit yang ditularkan oleh nyamuk yang masih menjadi masalah di Kalimantan Barat. Pencegahan gigitan nyamuk tersebut adalah dengan menggunakan repelan (penolak nyamuk). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas repelan minyak atsiri daun *Citrus microcarpa* terhadap *Aedes aegypti* L. dan *Culex quinquefasciatus* S. dengan menggunakan metode WHOPES (*World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*) serta menentukan dosis efektif (ED₅₀ dan ED₉₉). Minyak atsiri dilarutkan (10, 20, 30, 40, dan 50%) dalam 10 mL etanol 70% dan diaplikasikan pada lengan probandus. Data yang diperoleh dihitung menggunakan rumus persen proteksi dan dianalisis menggunakan *One-Way* ANOVA. ED₅₀ dan ED₉₉ dihitung menggunakan *software* statistik probit. Hasil menunjukkan bahwa minyak atsiri daun *Citrus microcarpa* memiliki aktivitas repelan terhadap nyamuk *Aedes aegypti* L. dengan nilai ED₅₀ dan ED₉₉ masing-masing sebesar 16,70% dan 66,85%. Namun tidak diperoleh hasil terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus* S..

Kata kunci : repelan, daun *Citrus microcarpa*, *Aedes aegypti* L, *Culex quinquefasciatus* S., metode WHOPES

Abstract : Dengue hemorrhagic fever (DHF) and filariasis are mosquito-spread diseases which are still a problem in West Borneo. One way to prevent mosquito's bite by using a repellent. The aim of this study was to determine the repellent activity of essential oils from *Citrus microcarpa*'s leaves against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* S. following procedures recommended by WHOPES (*World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*) and estimate the effective doses (ED₅₀ and ED₉₉). Essential oils from *Citrus microcarpa*'s leaves was diluted (10, 20, 30, 40, and 50%) in 10 mL ethanol 70% and applied to the volunteer's forearm. The obtained data were calculated using the percent of protection formula and analyzed by *One-Way* ANOVA. ED₅₀ and ED₉₉ were calculated by probit statistic software. The result showed that essential oils from jeruk sambal's leaves had repellent activity against *Aedes aegypti* L., with the value of ED₅₀ and ED₉₉ were 16.70% and 66.85%, respectively. But there was no results from the testing against *Culex quinquefasciatus* S..

Keywords : repellent, leaves of *Citrus microcarpa*, *Aedes aegypti* L., *Culex quinquefasciatus* S., WHOPES method

PENDAHULUAN

Kalimantan Barat merupakan salah satu provinsi di Indonesia dengan sebagian besar berupa dataran rendah dan daerah rawa ⁽¹⁾. Kondisi tersebut merupakan tempat yang cocok untuk berkembangbiakan nyamuk, sehingga banyak masyarakat Kalimantan Barat menderita penyakit yang ditularkan oleh nyamuk, seperti DBD (Demam Berdarah Dengue) dan filariasis. DBD ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* L. dan filariasis ditularkan oleh nyamuk *Culex quinquefasciatus* S.. Angka kesakitan dan kematian kasus DBD pada tahun 2014 menunjukkan jumlah yang fluktuatif yaitu sebanyak 5.049 angka kesakitan dan 58 angka kematian. Penyebaran DBD terjadi di 14 kabupaten dengan kasus terbanyak di Kabupaten Ketapang yaitu sebanyak 931 kasus ⁽²⁾. Jumlah kasus filariasis pada tahun 2014 sebanyak 263 kasus, dengan jumlah kasus terbanyak terjadi di Kabupaten Sambas yaitu 67 kasus filariasis ⁽³⁾.

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mencegah gigitan nyamuk adalah dengan menggunakan repelan. Repelan adalah suatu senyawa yang mempunyai kemampuan mencegah antropoda (termasuk nyamuk) untuk terbang, mendarat atau menggigit pada permukaan kulit manusia ⁽⁴⁾. Namun, sebagian besar repelan yang beredar di pasaran mengandung bahan aktif *N,N*-Diethylmeta-toluamide (DEET) yang tidak aman bagi kesehatan dan lingkungan ^(5,6). Oleh karena itu, perlu digali potensi alam Kalimantan Barat yang diperkirakan dapat digunakan sebagai repelan alami yang lebih aman dan ramah lingkungan.

Salah satu tanaman yang banyak dijumpai di Kalimantan Barat adalah tanaman jeruk sambal (*Citrus microcarpa*). Berdasarkan penelitian sebelumnya, minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* memiliki aktivitas repelan yang lebih baik daripada minyak atsiri tanaman jeruk lain, yaitu *C. maxima*, *C. reticulate*, *C. sinensis*, *C. hystrix*, *C.*

aurantium dan *C. medica* ⁽⁷⁾. Namun, belum pernah dilakukan pengujian aktivitas repelan daun *C. microcarpa*. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas repelan adalah metode WHOPES (*World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*). WHOPES merupakan metode dengan prosedur dan kriteria terstandar oleh WHO (*World Health Organization*) untuk pengujian dan evaluasi aktivitas repelan pada kulit manusia ⁽⁸⁾.

METODOLOGI

Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimental *post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret hingga Juni 2015 yang bertempat di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Tanjungpura Pontianak dan Laboratorium Entomologi Balai Penelitian dan Pengembangan P2B2 (Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang) Tanah Bumbu, Kalimantan Selatan.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk sambal (*C. microcarpa*) dari Jalan Kalimas Tengah, etanol 70% teknis, natrium sulfat anhidrat (Na_2SO_4), plat KLT silika gel 60 GF₂₅₄ berukuran 1,5x8 cm, toluen p.a, etil asetat ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$) p.a, pereaksi Liebermann Burchard (CH_3COOH glasial p.a dan larutan H_2SO_4 pekat p.a), larutan gula 10%, kertas saring, dan akuades.

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat destilasi uap, neraca analitik (Bel Engineering® L4501), *chamber* KLT (Camag®), kandang pengembangbiakan nyamuk berukuran 45x45x45 cm yang terbuat dari aluminium, kandang uji nyamuk berukuran 25x25x25 cm yang terbuat dari plastik, aspirator, termometer, higrometer, piknometer (Pyrex®), refraktometer, mikropipet 1000 μL (LabMate®), sarung

tangan lateks, *stopwatch*, *counter*, kulkas (LG® V212SLT-GN), dan alat-alat gelas.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Ae. aegypti* L. dan *Cx quinquefasciatus* S. betina dewasa yang diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan P2B2 (Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang) Tanah Bumbu, Kalimantan Selatan.

Penyulingan Minyak Atsiri dengan Destilasi Uap

Simplisia segar daun *C. microcarpa* sebanyak 20 kg disuling dengan destilasi uap. Minyak dimurnikan dengan penambahan Na₂SO₄ anhidrat dan disimpan dalam wadah kaca gelap pada suhu 4°C ⁽⁹⁾. Minyak atsiri daun *C. microcarpa* diperoleh sebanyak 66 mL, sehingga rendemen yang diperoleh sebesar 0,29 %.

Uji Mutu Minyak Atsiri

1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan meliputi uji organoleptik dan identifikasi minyak atsiri. Minyak atsiri memberikan penampilan jernih dan berwarna kekuningan, serta beraroma khas jeruk. Identifikasi minyak atsiri menunjukkan hasil positif dengan tidak terlihat noda transparan pada kertas saring.

2. Penentuan Bobot Jenis Minyak Atsiri

Penentuan bobot jenis minyak atsiri menggunakan piknometer. Bobot jenis minyak atsiri sebesar 0,8786 g/mL.

3. Penetapan Indeks Bias Minyak Atsiri

Penetapan indeks bias dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer. Indeks bias yang diperoleh sebesar 1,49.

Skrining Fitokimia

1. Uji Tabung Pemeriksaan Terpenoid

Minyak atsiri ditambahkan dengan 1 mL pereaksi Lieberman-Burchard. Hasil

yang diperoleh adalah positif terpenoid dibuktikan dengan terbentuknya warna merah ⁽¹⁰⁾.

2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Pemeriksaan Terpenoid

Dibuat fase gerak toluen : etil asetat (95:5). Penampak bercak digunakan penyemprot Liebermann-Burchard, plat dipanaskan selama 5 menit pada suhu 105°C setelah proses elusi. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu ⁽¹¹⁾.

Penetapan Kelompok Uji

Terdapat 2 kelompok pada pengujian ini, yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok uji. Kelompok kontrol negatif adalah pengujian aktivitas repelan tanpa minyak atsiri (hanya menggunakan etanol 70%) yang dilakukan pada saat awal (di lengan kiri) dan akhir pengujian (di lengan kanan). Kelompok uji adalah pengujian aktivitas repelan dengan minyak atsiri (konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%) yang dilakukan di lengan kiri ⁽⁸⁾.

Uji Perlakuan Menggunakan Metode WHOPEs

Uji aktivitas repelan menggunakan nyamuk betina berusia 3-5 hari dan lapar (tidak diberi makan 12 jam). Area uji dilakukan dari pergelangan tangan hingga siku. Kedua lengan probandus dibersihkan dengan air dan keringkan dengan handuk. Pertama, lengan kiri yang telah diolesi etanol 70% (kontrol negatif) dimasukkan ke dalam kandang uji nyamuk dan diamati nyamuk yang hinggap selama 30 detik. Jika nyamuk yang hinggap ≥ 10 , maka uji dapat dilanjutkan. Kemudian lengan yang sama diolesi dengan dosis minyak atsiri paling rendah yaitu 10%, lalu dimasukkan kembali ke dalam kandang untuk diamati selama 30 detik. Prosedur ini diulangi pada lengan yang sama untuk setiap kenaikan dosis secara berurutan selama 30 detik per masing-masing dosis. Data divalidasi dengan cara lengan kanan diolesi etanol 70% dan dimasukkan ke dalam kandang yang sama untuk memastikan jumlah

nyamuk yang hinggap pada lengan tersebut ≥ 10 nyamuk dalam periode waktu 30 detik. Uji dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Pengujian kedua dan ketiga dilakukan pada hari yang berbeda, yaitu hari berikutnya pada waktu uji yang sama. Nyamuk yang digunakan pada setiap pengulangan merupakan sampel yang berbeda dari sampel nyamuk yang digunakan pada pengujian sebelumnya⁽⁸⁾. Pengujian aktivitas dilakukan pada tiga probandus dalam satu hari yaitu probandus 1, 2, dan 3

Analisis Hasil Penelitian

Persen proteksi dinilai sebagai perbandingan jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan perlakuan dengan jumlah nyamuk yang tidak diberi perlakuan (hanya pemberian etanol 70%). Persen proteksi dapat dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\text{Persen Proteksi \%} = \frac{\Sigma C - \Sigma T}{\Sigma C}$$

Keterangan :

C = jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok kontrol negatif

T = jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok uji

Data dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi *Statistical Program SPSS 18 trial* yaitu analisa regresi *probit-plane* untuk menentukan ED₅₀ dan ED₉₉. ED₅₀ dan ED₉₉ adalah konsentrasi yang dapat menyebabkan daya proteksi sebesar 50 % dan 99 %⁽¹³⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Minyak Atsiri Daun *C. microcarpa* terhadap Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S.

Pengujian aktivitas repelan daun *C. microcarpa* terhadap nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. mengalami kegagalan berupa tidak ada nyamuk yang hinggap di lengan saat pemberian kontrol negatif. Berbagai faktor telah dilakukan untuk mengoptimasi kondisi pengujian yaitu suhu 27-28°C, kelembaban 60-80%, dan pencahayaan lingkungan

12:12 (terang:gelap). Suhu dan kelembaban berkaitan dengan proses metabolisme dan keadaan oviparitas yang menjadi penentu keaktifan nyamuk dalam mendeteksi host untuk digigit atau dikonsumsi darahnya⁽¹⁸⁾. Cara lain yang dilakukan adalah dengan melakukan pengujian pada malam hari pukul 19.30 WITA, karena nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. aktif pada malam hari (aktif pada pukul 18.00-02.00)^(8,12). Nyamuk yang akan digunakan, dipuaskan selama 12 jam sebelum pengujian, hal tersebut dilakukan untuk membuat nyamuk menjadi lapar sehingga nyamuk akan bergerak secara agresif untuk mencari makanannya (darah) ketika dilakukan pengujian. Namun, nyamuk tidak memberikan respon yang baik. Beberapa penelitian menyatakan bahwa nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. lebih sensitif terhadap minyak atsiri jika dibandingkan dengan spesies nyamuk lainnya^(7,12).

Uji Aktivitas Minyak Atsiri Daun *C. microcarpa* terhadap Nyamuk *Ae. aegypti* L..

Penelitian ini dilakukan pukul 09.00 WITA (aktif pukul 08.00-16.00). Diperoleh data berupa persen proteksi daun *C. microcarpa* terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L.. Hasil perhitungan persen proteksi disajikan dalam Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan adanya peningkatan rerata persen proteksi terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. sesuai dengan peningkatan konsentrasi daun *C. microcarpa*.

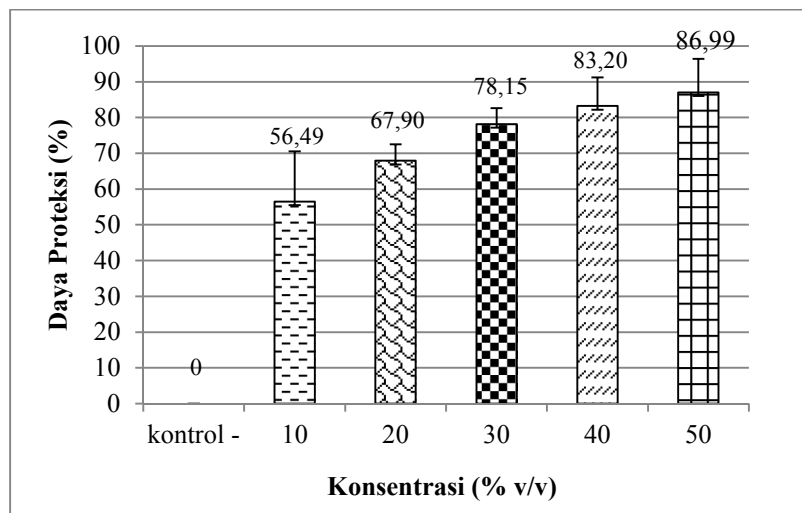
Analisis *one-way* ANOVA untuk melihat adanya perbedaan signfikansi (bermakna) antar kelompok. Hasil yang diperoleh adalah $p=0,000$ ($p<0,05$) yang artinya terdapat perbedaan bermakna persen proteksi minyak atsiri daun *C. microcarpa* antar kelompok pengujian, uji *Post-Hoc* untuk mengetahui konsentrasi yang memiliki perbedaan bermakna tersebut. Berdasarkan hasil uji *Post-Hoc*, diperoleh data bahwa semua konsentrasi

uji memiliki perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap kontrol negatif. Hal tersebut mengindikasikan bahwa daun *C. microcarpa* memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L..

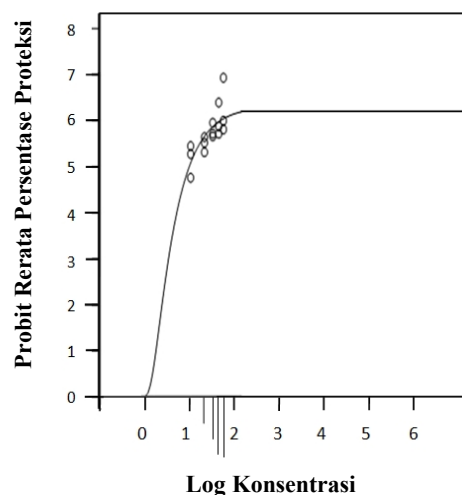
Daun *C. microcarpa* memiliki komponen utama minyak atsiri berupa sitronelal, β -sitral, β -pinen, β -sitronelol, geraniol asetat, 4-metil-1(1-metiletil)-3-sikloheksen-1-ol, β -trans osimena, linalool, linalil asetat ⁽¹⁴⁾. Senyawa-senyawa yang memiliki khasiat sebagai repelan adalah sitronelal, sitronelol, geraniol ⁽¹⁵⁾. Senyawa minyak atsiri lainnya yang memiliki khasiat sebagai repelan adalah linalool. Linalool merupakan senyawa kimia tanaman yang memiliki bau menyengat dan sangat tidak

disukai nyamuk ⁽¹⁶⁾. Berdasarkan hal tersebut, maka diduga bahwa senyawa pada daun *C. microcarpa* yang berperan memberikan aktivitas sebagai repelan adalah sitronelal, sitronelol, dan linalool.

Mekanisme kerja repelan secara umum pada senyawa metabolit sekunder dalam tanaman berkaitan dengan indera penciuman nyamuk. Sifat dari tanaman yang mudah menguap dimanfaatkan sebagai *chemical messengers* bagi serangga sebagai sinyal dalam memberikan peringatan untuk memunculkan respon penolakan atau memblok indera penciuman nyamuk sehingga nyamuk tidak mengenali mangsanya ⁽¹⁷⁾.



Gambar 1. Grafik Hubungan antara Rerata Persentase Daya Proteksi Minyak Atsiri daun *C. microcarpa* terhadap Nyamuk *Ae. aegypti* L.



Gambar 2. Grafik Sigmoid Hubungan antara Log Konsentrasi dan Persen Proteksi

Analisis probit dilakukan untuk mengetahui estimasi besar konsentrasi minyak atsiri daun *C. microcarpa* yang memberikan persen proteksi sebesar 50% dan 99% (ED₅₀ dan ED₉₉) terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. Hasil yang diperoleh dari analisis probit, menyatakan bahwa estimasi besar konsentrasi yang memiliki persen proteksi terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. sebesar 50% (ED₅₀) adalah konsentrasi 16,70%, sedangkan konsentrasi yang memiliki daya proteksi terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. sebesar 99% (ED₉₉) adalah konsentrasi 66,85%. Gambar 2 merupakan grafik sigmoid yang menunjukkan sebagai identitas dosis efektif minyak atsiri sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. yaitu ED₅₀ dan ED₉₉.

KESIMPULAN

Setelah melakukan penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Minyak atsiri daun *C. microcarpa* memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L.. Namun, pada pengujian aktivitas repelan terhadap nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. tidak diperoleh hasil.
2. Dosis efektif tengah (ED₅₀) daun *C. microcarpa* yang dihasilkan sebesar 16,70% dan dosis efektif maksimum (ED₉₉) adalah sebesar 66,85%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang turut membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soendoro T. Laporan hasil riset kesehatan dasar (Riskesdas) Provinsi Kalimantan Barat tahun 2007. Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI; 2009.
2. Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat. Data kesakitan dan kematian

DBD tahun 2009-2014 Provinsi Kalimantan Barat. Pontianak : Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat; 2015.

3. Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat. Data kasus klinis filariasis per Kabupaten di Provinsi Kalimantan Barat tahun 2014. Pontianak : Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat; 2015.
4. Nerio L.S., Olivero-Verbel, J., and Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: A Review, Bioresour. Technol. 2010; 101:372–78.
5. Koren G, Matsui D, dan Bailey B. DEET based insect repellents safety implication for children, pregnant and lactating women. C.M.A.J. 2003; 169(3):209-212.
6. Fradin M.S, Day J.F. Comparative efficacy of insect repellent against mosquito bites. N. Eng. J. Med. 2002; 347 : 13-18.
7. Phukerd, U., M. Soonwera, dan O.Wongnet. 2013. Repellent activity of essential oils from Rutaceae plants against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Journal of Agricultural Technology. 2013; 9(6):1585-94.
8. WHO. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. World Health Organization; 2009.
9. Ketaren S. Pengantar teknologi minyak atsiri. Jakarta : Balai Pustaka; 1985.
10. Kristanti AN, Aminah NS, Tanjung M, Kurniadi B. Buku ajar fitokimia. Surabaya : Airlangga University Press; 2008.
11. Wagner H. Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas. Edisi

kedua. Munich: Springer Verlag; 1996 : 164, 335.

12. Tawatsin, A., Wratten, S. D., Scott, R. R., Thavara U., and Techadamrongsin, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology*. 2001; 26(1):233-34.
13. Medikanto, B. R., Setyaningrum, E., dan Biomed, M., Pengaruh ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia* L.) sebagai *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*. *Medical Journal of Lampung University*. 2013; 2(4):37-39.
14. Yulliasri, J., Praptiwi dan Andria A. Komponen kimia dan efek antibakteri minyak atsiri kulit buah dan daun jeruk kasturi (*Citrus microcarpa* Bunge). *Majalah Farmasi Indonesia*. 2000; 11(2):77-85.
15. Flona S. Herba dan tanaman hias, penangkal nyamuk dan polusi udara. Samidra Utama. Jakarta; 2006.
16. Marina R, Endang PA. Potensi daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*) dan mangkokan (*Notopanax scutellarium*) sebagai repelan nyamuk *Aedes albopictus*. *Aspirator*. 2012; 4(2):85-91.
17. Kalita, Bhupen., et al. Plant Essential oils as mosquito repellent-A review. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*. 2013; 3(1):741-747.
18. Reiter P. Climate change and mosquito - borne disease. *Environmental Health perspectives*. Volume 109, Supplement 1; 2001.